

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-75849

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/195		C 0 7 K 14/195	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
9/16		9/16	A
// (C 1 2 N 1/21			

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-239440	(71) 出願人	000001144 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 9月4日	(72) 発明者	松井 郁夫 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術 院 生命工学工業技術研究所内
		(72) 発明者	石川 一彦 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術 院 生命工学工業技術研究所内
		(72) 発明者	小杉 佳次 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術 院 生命工学工業技術研究所内
		(74) 指定代理人	工業技術院生命工学工業技術研究所長 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイロコッカス属に属する超好熱性細菌由来の耐熱性 F l a p エンドヌクレアーゼ

(57) 【要約】

【解決手段】 至適温度が75℃以上である、耐熱性Flap
エンドヌクレアーゼ。以下の (a) 又は (b) のタンパ
ク質をコードするDNA

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタン
パク質

(b) アミノ酸配列 (a) において1若しくは数個のア
ミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列か
らなり、かつFlapエンドヌクレアーゼ活性を有するタン
パク質

【効果】 本発明により、反応の至適温度が75℃以上で
ある耐熱性Flapエンドヌクレアーゼを提供できる。さ
ら、本酵素が熱に安定であることから酵素反応をPCR
反応とカップルさせ、人為的に相同組換えや遺伝子シャ
プリングを高効率で行われる新手法の開発が可能にな
る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 至適温度が75℃以上である、耐熱性Flapエンドヌクレアーゼ。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつFlapエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号1で表されるDNAであることを特徴とする、請求項1記載のDNA。

【請求項4】 請求項2又は3記載のDNAを含む組み換えベクター。

【請求項5】 請求項4記載の組み換えベクターで形質転換した形質転換体。

【請求項6】 請求項4記載の形質転換体を培地中で培養して耐熱性Flapエンドヌクレアーゼを製造することを特徴とする耐熱性Flapエンドヌクレアーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、低い相同性に基づく遺伝子組換えや遺伝子シャフリングに有効な耐熱性のFlapエンドヌクレアーゼ及びその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、広範な遺伝子領域にランダム変異を導入する方法として、目的遺伝子の複製時に特定のヌクレオチドを欠乏させることにより遺伝子増幅反応(PCR)を行わせ変異を誘起する方法が有り、局所領域にランダム変異を導入する方法として、混合プライマーを用いるPCR反応により目的位置に変異を導入する方法がある。しかし、試験管内で低い相同性に基づく遺伝子組換えや遺伝子シャフリングを高効率に誘導する方法は未だ存在しない。生体内での遺伝子組換えや遺伝子シャフリングのメカニズムは図1のように考えられている。

図1において、ステップ1は3'-5'エキソヌクレアーゼによる5'一本鎖オーバーハングの形成を、ステップ2は低い相同性に基づく一時的塩基対の形成を、ステップ3はDNAポリメラーゼによるギャップの修復とFlap構造の形成を、ステップ4はFlapエンドヌクレアーゼによるFlap一本鎖の除去を、ステップ5はDNAリガーゼによるニックの連結をそれぞれ示している。しかし、各ステップを触媒する酵素の性質はあまり明らかではない。Flapエンドヌクレアーゼはステップ4を触媒する酵素である。Flapエンドヌクレアーゼ酵素は図2に示すとおりDNAのFlap構造を特異的に認識し、一本鎖部分(この部分がFlapと呼ばれる)を切断する酵素であり、哺乳動物細胞や酵母細胞から見出されているが、常温生物由来なので耐熱性に乏しく、PCR反応を含む人為的遺伝子シ

ャフリング反応には不適當である。

【0003】従来のFlapエンドヌクレアーゼ酵素は、高温で不安定であるため、試験管内で低い相同性に基づく遺伝子組換えや遺伝子シャフリングを高温下で高効率に誘導する方法の開発には使えない。しかし、耐熱性で高温で安定な機能を発揮するFlapエンドヌクレアーゼが得られれば、酵素反応をPCR反応とカップルさせ、人為的に相同組換えや遺伝子シャフリングを高効率で行わせる新手法の開発が可能となる。従って、高温下で安定な耐熱性Flapエンドヌクレアーゼの開発が渴望されていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記に鑑み、本発明の目的は新規な耐熱性Flapエンドヌクレアーゼ及びその遺伝子を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、以上のような課題を解決すべく、90-100℃で生育する超好熱性細菌に着目し、その遺伝子配列から本酵素活性を示すと推測される遺伝子を見出した。さらに、大腸菌を使ってその遺伝子から酵素を生産し、この酵素が高温(75℃以上)で安定にかつ構造特異的エンドヌクレアーゼ活性を示すことを確認し、本発明を完成するに至った。

【0006】即ち、本発明は、至適温度が75℃以上である耐熱性Flapエンドヌクレアーゼである。さらに、本発明は以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAである。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつFlapエンドヌクレアーゼ活性を有するタンパク質。

【0007】上記DNAの具体例としては配列番号1で表されるDNAが挙げられる。なお、上記アミノ酸の付加、欠失又は置換は周知技術である部位特定変異誘発(例えば、Nucleic Acid Reserch, Vol.10, No.20, p64 87-6500, 1982を参照)により実施することができ、アミノ酸の付加、欠失又は置換に関し、1又は複数のアミノ酸とは前記部位特定変異誘発法により付加、欠失又は置換できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0008】さらに、本発明は上記DNAを含む組み換えベクターである。さらに、本発明は上記DNAを含む組み換えベクターで形質転換した形質転換体である。さらに、本発明は上記形質転換体を培地中で培養して耐熱性Flapエンドヌクレアーゼを製造することを特徴とする耐熱性Flapエンドヌクレアーゼの製造方法である。

【0009】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。本発明で使用した超好熱性細菌は、硫黄代謝好熱性

3

古細菌パイロコッカス・ホリコシJCM9974である。

【0010】本発明の耐熱性Flapエンドヌクレアーゼは次の方法によって得た。パイロコッカス・ホリコシJCM9974の染色体DNAを鋳型として、実施例6で示すアッパープライマーとローワープライマーとを用い、PCR反応を行い、Flapエンドヌクレアーゼ遺伝子を含むDNA断片を単離した。

【0011】この遺伝子を、タンパク質発現プラスミドpET 15bに挿入、その組み換えプラスミドを大腸菌に組み込み、その形質転換した大腸菌を培地中で培養して本酵素の生産を行った。生産された耐熱性Flapエンドヌクレアーゼ酵素は加熱処理およびカラムクロマトグラムで単離精製した。精製された耐熱性Flapエンドヌクレアーゼ酵素は、分子量約40,000のタンパク質で、図2に示したFlap型DNA基質を認識し、一本鎖オリゴヌクレオチド部分（Flap部分）を加水分解する酵素であることを確認した。

【0012】この酵素は1M NaClを含有する50mMリン酸緩衝液（pH7.5）中で95℃で数時間処理しても、活性の低下が見られなかった。さらに、活性の至適pHは6.0-8.0で、至適温度はpH8で約75℃以上であった。

【0013】

【発明の効果】本発明により、反応の至適温度が75℃以上である耐熱性Flapエンドヌクレアーゼを提供できる。さら、本酵素が熱に安定であることから酵素反応をPCR反応とカップルさせ、人為的に相同組換えや遺伝子シャフリングを高効率で行う新手法の開発が可能になる。

【0014】

【実施例】以下に本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】 菌の培養

パイロコッカス・ホリコシJCM9974は次の方法で培養した。13.5gの食塩、4gのNa₂SO₄、0.7gのKCl、0.2gのNaHCO₃、0.1gのKBr、30mgのH₃BO₃、10gのMgCl₂・6H₂O、1.5gのCaCl₂、25mgのSrCl₂、1.0mlのレザスリン溶液（0.2g/L）、1.0gの酵母エキス、5gのバクトペプトンを1Lに溶かし、この溶液のpHを6.8に調整し加圧殺菌した。ついで、乾熱滅菌した元素硫黄を0.2%となるように加え、この培地をアルゴンで飽和して嫌気性とした後、パイロコッカス・ホリコシJCM9974を植菌した。培地が嫌気性となったか否かはNa₂S溶液を加えて、培養液中でNa₂Sによるレザスリン溶液のピンク色が着色しないことにより確認した。この培養液を95℃で2〜4日培養し、得られる培養物を5000rpm、10分間の遠心分離して集菌し、菌体1gを得た。

【0015】【実施例2】 染色体DNAの調整

パイロコッカス・ホリコシJCM9974の染色体DNA

4

Aは以下の方法により調製した。実施例1で得た菌体の0.1gを10mM Tris（pH7.5）1mM EDTA溶液で2回洗浄後InCert Agarose（FMC社製）ブロック中に封入する。このブロックを1% N-ラウロイルサルコシン（laurylsarcosine）、1mg/ml プロテアーゼK溶液中で処理することにより、染色体DNAはAgaroseブロック中に分離調製される。

【0016】【実施例3】 染色体DNAを含むライブラリークローンの作製

実施例2で得られた染色体DNAを制限酵素HindIIIにより部分分解後アガロースゲル電気泳動により約40kb長の断片を調製した。このDNA断片と制限酵素HindIIIによって完全分解したBacベクターpBAC108L（Ung-Jon Kim et.al. Nucleic Acid Research, 20(5) 1083-1085(1992)）及びpFOS1（Ung-Jon Kim et.al. Nucleic Acid Research, 20(5) 1083-1085(1992)）とをT4リガーゼを用いて結合させた。前者のベクターを用いた場合には結合終了後のDNAをただちに大腸菌内へ電気穿孔法により導入した。後者のベクターpFOS1を用いた場合には結合終了後のDNAをGIGA Pack Gold（ストラタジーン社製）により試験管内で入ファージ粒子内に詰め込み、この粒子を大腸菌に感染させることによりDNAを大腸菌内に導入した。これらの方法により得られた抗生物質クロラムフェニコール耐性的大腸菌集団をBAC及びFosmidライブラリーとした。ライブラリーからパイロコッカス・ホリコシJCM9974の染色体をカバーするのに適したクローンを選択して、クローンの整列化を行った。

【0017】【実施例4】 各BAC或いはFosmidクローンの塩基配列決定

整列化されたBAC或いはFosmidクローンについて順次以下の方法で塩基配列を決定していった。大腸菌より回収した各BAC或いはFosmidクローンのDNAを超音波処理することにより断片化し、アガロースゲル電気泳動により1kb及び2kb長のDNA断片を回収した。この断片をプラスミドベクターpUC118のHincII制限酵素部位に挿入したショットガンクローンを各BAC或いはFosmidクローン当たり500クローン作製した。各ショットガンクローンの塩基配列をパーキンエルマー、ABI社製自動塩基配列読み取り装置373または377を用いて決定していった。各ショットガンクローンから得られた塩基配列を塩基配列自動連結ソフトSequencherを用いて連結編集し、各BAC或いはFosmidクローンの全塩基配列を決定していった。

【0018】【実施例5】 Flapエンドヌクレアーゼ遺伝子の同定

上記で決定された各BAC或いはFosmidクローンの塩基配列の大型計算機による解析を行い、Flapエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子が同定された。この遺伝子の配列を配列番号1に示す。そして、この塩基配列から演

題されるアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0019】〔実施例6〕 発現プラスミドの構築
構造遺伝子領域の前後に制限酵素（NdeIとXhoI）サイトを構築する目的でDNAプライマーを合成し、PCRでその遺伝子の前後に制限酵素サイトを導入した。

アッパー
ブライマー
 5'GGGAATTCCTGCAGATCGCATATGGGTGTTCTATCGGTGAC3'

ローワー プライマー
5' ACTAATCCCGGGTACCTCGAGGCTATAGACTTTAGGGTTTCT3'

PCR反応後、制限酵素 (NdeIとXhoI) で完全分解 (37 °Cで2時間) した後、その構造遺伝子を精製した。

【0020】pET-15b、(Novagen社製)を制限酵素NdeIとXhoIで切断・精製した後、上記の構造遺伝子とT4リガーゼで16℃、2時間反応させ連結した。連結したDNAの一部をE.coli-XL 1-BlueMRF1のコンピテントセルに導入し、形質転換体のコロニーを得た。得られたコロニーから発現プラスミドをアルカリ法(Sambrook, J. et. al. 1. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory(1989))で精製した。

【0021】〔実施例7〕 組換え遺伝子の発現
大腸菌 (E.coli BL21(DE3)、Novagen 社製) のコンピテ
ントセルを融解して、ファルコンチューブに0.1ml移
す。その中に発現プラスミド溶液0.005ml を加え氷中に
30分間放置した後42℃でヒートショックを30秒間行い、
SOC medium 0.9mlを加え、37℃で1時間振とう培養
する。その後アンピシリンを含む2YT寒天プレートに
適量まき、37℃で一晩培養し、形質転換体を得た。この
形質転換体は平成9年8月18日に工業技術院生命工学
工業研究所に FERM P-16389 として寄託されている。

【0022】この形質転換体をアンピシリンを含む2YT培地(2L)で600nmの吸収が1に達するまで培養した後、IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)を加えさらに6時間培養した。培養後遠心分離(6,000rpm, 20min)で菌菌し、菌体30gを得た。

【0023】（実施例8）耐熱性酵素の精製
集菌した菌体30gを-20℃で凍結融解し、菌体量の2倍のアルミナと1mgのDNaseを加え、菌体を粉砕した後、5倍量の10mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を加え懸濁液を得た。得られた懸濁液を85℃で30min加熱後遠心分離（11,000rpm、20min）し、上澄をNi-カラム（Novagen, His-Bind metal chelation resin & His-Bind buffer kitを使用）による親和性クロマトグラムを行った。ここで得られた60mMイミダゾール流出画分をHiTrap SP（ファルマシア社製）カラムに吸着させ、NaCl濃度勾配による溶出を行い活性画分を得た。さらに得られた活性画分溶液をHitrap Heparinカラム（ファルマシア社製）に通し、NaCl濃度勾配による溶出を行い精製酵素1mgを得た。

【0024】〔实施例9〕

酵素反应条件

(1) 合成オリゴヌクレオチド

全てのオリゴヌクレオチドはグライナー・ジャパン株式会社により合成された。各オリゴヌクレオチドの名称と配列は以下の様である。

F_{br} strand: 5'-GGACTCTGCCTCAAGACGGTAGTCAACGTG-3'

F_{ad}i strand: 5'-CTGCCATCAGTTGCAC-3'

Flap strand: 5'-CCTGAGACGGAGTTTCAATCCTGACGAACTGTA
G-3'

【0025】(2) Flap基質(図2)の調整

[γ - ^{32}P] ATPと T_4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて酵素で切断されることになる Flap strandの5'端を ^{32}P ラベル化した。ラベル化された Flapstrandを F_{br} strand、F_{adj} strandと共に150mM NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) の中で煮沸し、溶液の温度を徐々に4℃まで下げるによりアニーリングさせた。

【0026】(3) Flapエンドヌクレアーゼ活性

15mlの50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8、1.5mM $MgCl_2$ 、0.5mM b-メルカプトエタノール、100mg/ml 牛血清アルブミン) に400fmol の ^{32}P ラベル化Flap基質と酵素を加え、50℃で30分間反応させた。次に15mlの95%ホルムアミド、10mM EDTA、1mg/ml キシレンシアノールを加え酵素反応を停止させた。さらにこの反応液を95℃、5分間加熱し、7M尿素と1×TBE (89mM トリス、89mM 硼酸、2mM EDTA、pH8) を含む15%ポリクアリルアミドゲル (16×45cm) に添加し、2000Vで2時間泳動した。反応産物はモレキュラーイメージャーGS-525 (Bio-rad社) で画像化、定量化された。活性の一ユニットは通常のFlapエンドヌクレアーゼ活性測定条件下、1fmolのFlap基質を分解する酵素量と規定される。酵素の諸性質

【0027】(1) 基質特異性

本酵素は単純な二本鎖DNAや一本鎖DNAには作用せず、図2の様なDNA構造体の一本鎖DNA部分(Flag)を根本から切り出すエンドヌクレアーゼ活性を有する。図2に示す基質の一例においては矢印が切断点を示し、20mer の一本鎖DNAを遊離する。また、当酵素の活性はDNAの塩基配列には依存しない。

40 【0028】(2) 至適pH

酵素活性の最適pHの測定は、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液、50mM リン酸緩衝液及び 50mM ほう酸緩衝液中 (pH 4~9) に、 ^{32}P ラベル化Flap基質 (図2) を400fmol 含む溶液を調整し、50℃で酵素の加水分解活性の初速度を測定することにより求めた。pH6.0-8.0近傍で最大初速度が得られたため、最適pHは6.0-8.0と結論した。

【0029】(3) 至適溫度

基質として ^{32}P ラベル化Flap基質(図2)を400fmol 使用し、50mM リン酸緩衝液(pH8.0)中に一定量の酵素

を加えて30分反応させ、相対活性を調べた。最大活性（至適温度）は75℃以上であった。

【0030】(4) 耐熱性

当該酵素を0.1mg/mlの濃度で含む水溶液（50mMリン酸緩衝液、pH8.0、1M NaCl）を95℃で5時間加熱後、残存活性を調べた。その結果95℃における活性の半減期は5時間であった。また、走査型指差熱測定計（DSC）を用い熱変性を調べた。0.5mg/mlの当該酵素溶液（50mMリン酸緩衝液pH8.0、1M NaCl）を用い、0～125℃で測定したところ、熱変性温度（T_m）が103℃であることが明らかとなった。

*【0031】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1032

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

10 特徴を表す記号：CDS

* 存在位置：1..1029

配列

ATG GGT GTT CCT ATC GGT GAC CTC GTT CCG AGG AAG GAG ATA GAT CTT	48
Met Gly Val Pro Ile Gly Asp Leu Val Pro Arg Lys Glu Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
GAA AAT CTG TAT GGA AAG AAG ATA GCG ATA GAT GCC CTA AAC GCC ATC	96
Glu Asn Leu Tyr Gly Lys Lys Ile Ala Ile Asp Ala Leu Asn Ala Ile	
20 25 30	
TAT CAG TTT TTA TCA ACG ATA AGA CAG AGG GAT GGA ACA CCA CTT ATG	144
Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Ile Arg Gln Arg Asp Gly Thr Pro Leu Met	
35 40 45	
GAC TCT AAG GGT AGG ATA ACC TCT CAT TTA AGT GGG CTC TTT TAT AGA	192
Asp Ser Lys Gly Arg Ile Thr Ser His Leu Ser Gly Leu Phe Tyr Arg	
50 55 60	
ACG ATA AAT CTA ATG GAA GCC GGT ATT AAG CCG GCC TAC GTC TTT GAT	240
Thr Ile Asn Leu Met Glu Ala Gly Ile Lys Pro Ala Tyr Val Phe Asp	
65 70 75 80	
GGA AAG CCT CCG GAA TTC AAA AGG AAG GAG CTC GAA AAA AGG AGG GAA	288
Gly Lys Pro Pro Glu Phe Lys Arg Lys Glu Leu Glu Lys Arg Arg Glu	
85 90 95	
GCT AGA GAA GAG GCA GAA CTA AAA TGG AAA GAA GCT CTA GCC AAG GGA	336
Ala Arg Glu Glu Ala Glu Leu Lys Trp Lys Glu Ala Leu Ala Lys Gly	
100 105 110	
AAC CTG GAG GAA GCT AGG AAA TAC GCT CAA AGG GCA ACT AAG GTT AAT	384
Asn Leu Glu Glu Ala Arg Lys Tyr Ala Gln Arg Ala Thr Lys Val Asn	
115 120 125	
GAA ATG CTA ATC GAA GAT GCA AAG AAG CTT TTG CAA CTA ATG GGA ATA	432
Glu Met Leu Ile Glu Asp Ala Lys Lys Leu Leu Gln Leu Met Gly Ile	
130 135 140	
CCA ATA ATT CAG GCT CCA AGT GAA GGA GAA GCC CAA GCG GCA TAC ATG	480
Pro Ile Ile Gln Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ala Tyr Met	
145 150 155 160	
GCA AGT AAA GGG GAT GTC TAC GCG TCA GCG AGT CAA GAT TAT GAT TCA	528
Ala Ser Lys Gly Asp Val Tyr Ala Ser Ala Ser Gln Asp Tyr Asp Ser	
165 170 175	
CTA CTC TTT GGT GCT CCA AGG TTG ATT AGG AAT CTG ACA ATT ACG GGA	576
Leu Leu Phe Gly Ala Pro Arg Leu Ile Arg Asn Leu Thr Ile Thr Gly	
180 185 190	
AAA AGA AAG ATG CCT GGG AAA GAT GTT TAC GTT GAA ATA AAG CCA GAG	624
Lys Arg Lys Met Pro Gly Lys Asp Val Tyr Val Glu Ile Lys Pro Glu	

9	195	200	205	10
TTA GTA GTT CTA GAT GAG GTA CTA AAA GAG CTT AAG ATA ACA AGA GAA	672			
Leu Val Val Leu Asp Glu Val Leu Lys Glu Leu Lys Ile Thr Arg Glu				
210 215 220				
AAG CTT ATA GAA CTT GCA ATT CTG GTT GGG ACT GAC TAT AAT CCT GGG	720			
Lys Leu Ile Glu Leu Ala Ile Leu Val Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gly				
225 230 235 240				
GGC GTA AAG GGG ATA GGA CCT AAG AAG GCC CTT GAG ATT GTA AGA TAT	768			
Gly Val Lys Gly Ile Gly Pro Lys Lys Ala Leu Glu Ile Val Arg Tyr				
245 250 255				
TCA AGG GAT CCC CTA GCA AAG TTC CAA AGA CAG AGC GAT GTG GAT CTT	816			
Ser Arg Asp Pro Leu Ala Lys Phe Gln Arg Gln Ser Asp Val Asp Leu				
260 265 270				
TAC GCT ATT AAG GAA TTC TTC CTT AAC CCT CCT GTC ACT AAT GAA TAC	864			
Tyr Ala Ile Lys Glu Phe Phe Leu Asn Pro Pro Val Thr Asn Glu Tyr				
275 280 285				
TCG CTT AGT TGG AAG GAG CCT GAT GAG GAA GGA ATA TTA AAA TTC CTC	912			
Ser Leu Ser Trp Lys Glu Pro Asp Glu Glu Gly Ile Leu Lys Phe Leu				
290 295 300				
TGT GAT GAG CAT AAT TTT AGC GAA GAA AGG GTA AAA AAT GGG ATA GAA	960			
Cys Asp Glu His Asn Phe Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Gly Ile Glu				
305 310 315 320				
AGA CTA AAA AAG GCG ATA AAA GCT GGA AGA CAA TCA ACG CTT GAG AGT	1008			
Arg Leu Lys Lys Ala Ile Lys Ala Gly Arg Gln Ser Thr Leu Glu Ser				
325 330 335				
TGG TTC GTT AAA AAG AAA CCC TAA	1032			
Trp Phe Val Lys Lys Pro				
340				

【0032】配列番号：2

配列の長さ：343

配列の型：アミノ酸

配列

30*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ヘアチド

Met Gly Val Pro Ile Gly Asp Leu Val Pro Arg Lys Glu Ile Asp Leu			
1 5 10 15			
Glu Asn Leu Tyr Gly Lys Lys Ile Ala Ile Asp Ala Leu Asn Ala Ile			
20 25 30			
Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Ile Arg Gln Arg Asp Gly Thr Pro Leu Met			
35 40 45			
Asp Ser Lys Gly Arg Ile Thr Ser His Leu Ser Gly Leu Phe Tyr Arg			
50 55 60			
Thr Ile Asn Leu Met Glu Ala Gly Ile Lys Pro Ala Tyr Val Phe Asp			
65 70 75 80			
Gly Lys Pro Pro Glu Phe Lys Arg Lys Glu Leu Glu Lys Arg Arg Glu			
85 90 95			
Ala Arg Glu Glu Ala Glu Leu Lys Trp Lys Glu Ala Leu Ala Lys Gly			
100 105 110			
Asn Leu Glu Glu Ala Arg Lys Tyr Ala Gln Arg Ala Thr Lys Val Asn			
115 120 125			

1 1 1 2
 Glu Met Leu Ile Glu Asp Ala Lys Lys Leu Leu Gln Leu Met Gly Ile
 130 135 140
 Pro Ile Ile Gln Ala Pro Ser Glu Gly Glu Ala Gln Ala Ala Tyr Met
 145 150 155 160
 Ala Ser Lys Gly Asp Val Tyr Ala Ser Ala Ser Gln Asp Tyr Asp Ser
 165 170 175
 Leu Leu Phe Gly Ala Pro Arg Leu Ile Arg Asn Leu Thr Ile Thr Gly
 180 185 190
 Lys Arg Lys Met Pro Gly Lys Asp Val Tyr Val Glu Ile Lys Pro Glu
 195 200 205
 Leu Val Val Leu Asp Glu Val Leu Lys Glu Leu Lys Ile Thr Arg Glu
 210 215 220
 Lys Leu Ile Glu Leu Ala Ile Leu Val Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Lys Gly Ile Gly Pro Lys Lys Ala Leu Glu Ile Val Arg Tyr
 245 250 255
 Ser Arg Asp Pro Leu Ala Lys Phe Gln Arg Gln Ser Asp Val Asp Leu
 260 265 270
 Tyr Ala Ile Lys Glu Phe Phe Leu Asn Pro Pro Val Thr Asn Glu Tyr
 275 280 285
 Ser Leu Ser Trp Lys Glu Pro Asp Glu Glu Gly Ile Leu Lys Phe Leu
 290 295 300
 Cys Asp Glu His Asn Phe Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Gly Ile Glu
 305 310 315 320
 Arg Leu Lys Lys Ala Ile Lys Ala Gly Arg Gln Ser Thr Leu Glu Ser
 325 330 335
 Trp Phe Val Lys Lys Lys Pro
 340

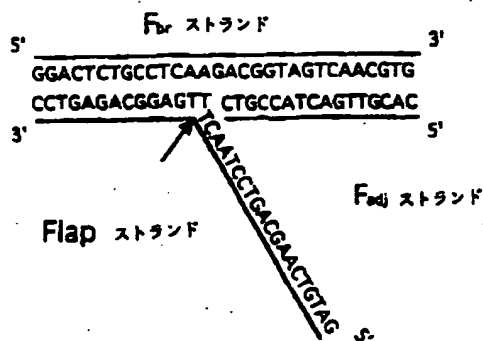
【図面の簡単な説明】

【図1】生体内で耐熱性Flapエンドヌクレアーゼの酵素活性の関与する相同組換えと遺伝子シャフリングメカニズムを示す図。Flapエンドヌクレアーゼはステップ4を*

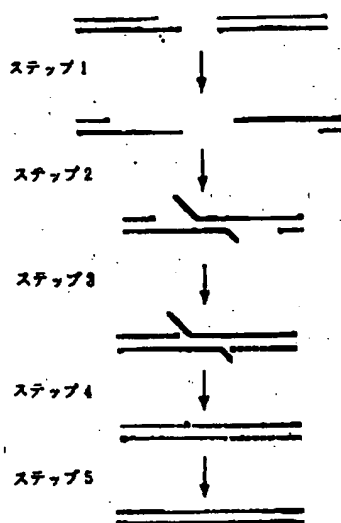
30*触媒する。

【図2】Flapエンドヌクレアーゼの基質となりうるDNA構造の一例を示す図。一本鎖部分がFlapと呼ばれる。矢印は本酵素による切断部位を示す。

【図2】



【図1】



【手続補正書】

【書類名】 受託番号変更届

【旧寄託番号】 FERM P-16389号

【提出日】 平成10年7月29日

【新寄託機関の名称】 工業技術院生命工学工業技術

【旧寄託機関の名称】 工業技術院生命工学工業技術研
究所

研究所

【新寄託番号】 FERM BP-6440号

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/16

C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 松井 えり子

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院 生命工学工業技術研究所内

(72)発明者 川崎 聡子

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院 生命工学工業技術研究所内